OECD/OCDE

2016/07/29

試験ガイドライン No.475

哺乳類骨髄染色体異常試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません**。本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。
本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。
This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2016), Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264786-en.

©OECD(2016)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

採択
2016 年 7 月 29 日

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

哺乳類骨髄染色体異常試験

はじめに

1. 経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学の進歩、規制要件の変化および動物福祉への配慮を踏まえて定期的に見直されている。試験ガイドライン 475 の初版は 1984 年に採択された。1997 年には、その当時までにもたらされた科学の進歩に基づき、改訂版が採択された。今回の改訂版試験ガイドラインは、30 年を超える本試験の実施経験およびそのデータの解釈から得られた科学的知識を反映したものである。本試験ガイドラインは、遺伝毒性に関する一連の試験ガイドラインの一部である。遺伝毒性試験およびその試験ガイドラインに行われた近年の変更概要について、簡潔な情報を示す文書が作成されている（1）。

2. 哺乳類を用いた *in vivo* 骨髄染色体異常試験は、動物種間に差がありうるとはいえ、*in vivo* での代謝、薬物動態および DNA 修復過程という要因が機能し、その反応に関与していることから、遺伝毒性の評価にとりわけ妥当なものである。*In vivo* 試験は、*in vitro* 試験系で検出された遺伝毒性をさらに詳しく検討する場合にも有用である。

3. 哺乳類を用いた *in vivo* 染色体異常試験では、被験化学物質によって誘発される染色体構造異常を検出するために、動物（通常はげっ歯類）の骨髄細胞を用いる（2）（3）（4）（5）。染色体構造異常には 2 つの型、すなわち染色体型または染色分体型があると考えられる。遺伝毒性化学物質により誘発される異常の大多数は染色分体型であるが、染色体型異常も生じる。染色体損傷およびその関連事象は、多くのヒト遺伝疾患の原因となり、これらの損傷や関連事象が、がん遺伝子や腫瘍抑制遺伝子の変化をもたらす場合、ヒトや実験系においてがんに関与するという実質的な証拠がある。*In vivo* 染色体異常試験では、倍数性（核内倍加を含む）を生じることが考えられる。ただし、倍数性それ自体の増加は、異数性誘発能を示すものではなく、単に細胞周期の乱れまたは細胞毒性を示しうるにすぎない。本試験は、異数性の測定を目的としてデザインされたものではない。異数性の検出に推奨される *in vivo* および *in vitro* 試験は、それぞれ哺乳類 *in vivo* 赤血球小核試験（試験ガイドライン 474）、哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験（試験ガイドライン 487）であると考えられる。

4. 用いる用語の定義を補遺 1 に示す。

© OECD, (2016)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

本ガイドラインは、書面による手続により 2016 年 7 月 29 日に OECD 理事会で採択された［C(2016)103］。

最初に考慮すべき事項

5. 本試験にはげっ歯類が日常的に用いられるが、科学的正当性がある場合、一部の例では他の動物種が適切であると考えられる。骨髄は高度な血管形成組織であり、また、容易に単離および処理可能な速やかに循環する細胞集団を含んでいることから、骨髄は本試験の標的組織である。ラット、マウス以外の動物種を用いる場合には、その科学的正当性を報告書に記載する。また、げっ歯類以外の動物種を用いる場合、骨髄染色体異常の測定を別の適切な毒性試験に組み込むことが推奨される。

6. 被験物質またはその代謝物が標的組織に到達しないという証拠がある場合、この試験を用いるのは不適切であると考えられる。

7. 規制上の目的を意図したデータ生成の場合、混合物について本試験ガイドラインを用いる前に、当該混合物がその目的に十分な結果を提示できるか否か、また提示できる場合にはその理由を検討する。当該混合物の試験に関する規制上の要件がある場合、こうした検討は不要である。

試験法の概要

8. 適切な曝露経路により動物を被験化学物質に曝露させ、投与後適切な時期に人道的に安楽死させる。安楽死の前に分裂中期停止剤（例：コルヒチンまたはコルセミド®）を動物に投与する。次に、骨髄細胞から染色体標本を作製、染色し、染色体異常について分裂中期細胞を分析する。

試験施設の習熟度の検証

習熟度の検討

9. 本試験を日常的に用いるのに先立ち、その試験実施について十分な経験を確立するため、試験施設は、例えば、表 1 収載の最低 2 種類の陽性対照物質（低用量の陽性対照により誘発される軽微な反応を含む）および適合性のある媒体／溶媒対照（22 項参照）を用い、染色体異常の出現頻度について公表データ（例：（6））から予測される結果の再現能力を立証する必要がある。これらの実験には、再現性があり用量依存的な増加がみられる複数の用量を用い、対象組織（骨髄）における試験系の感度および検出範囲について、当該試験施設内で採用されるスコアリング方法を用いて立証する必要がある。この要件は、経験を有する、すなわち 10〜14 項に定義された背景データベースを使用可能な試験施設には適用されない。

背景対照（historical control）データ

10. 習熟度の検討過程で、試験施設は以下を確立する必要がある。

- 陽性対照（historical positive control）の背景データの範囲および分布
- 陰性対照（historical negative control）の背景データの範囲および分布

11. まず陰性対照の背景データの分布データを得る場合、同時陰性対照が、公表されている対照データ（存在する場合）と一致している必要がある。背景対照の分布にはより多くの実験デ

© OECD, (2016)

ータが追加されるため、同時陰性対照は、理想的には背景対照の分布の 95%管理限界内とする。試験施設の陰性対照の背景データベースは、当該施設の陰性対照データの分布の評価能を確保するため、統計学的に頑健である必要がある。文献では、最低 10 回の実験の必要性が示唆されているが、望ましくは、比較可能な実験条件下で実施される 20 回以上の実験からなることが考えられる。試験施設では、管理図（例：C 管理図または X バー管理図（7））などの品質管理方法を用い、当該施設のデータにどの程度のばらつきがあるかを特定し、その試験方法が当該施設において「管理下にある」ことを示す必要がある。背景データの構築方法および使用方法（すなわち、背景データに関するデータの組み入れ基準および除外基準、ならびに所定の実験の許容基準）について、さらなる勧告が参考文献（8）に見出せる。

12. 習熟度の検討（9 項に記載）期間に、試験施設が統計学的に頑健な陰性対照の分布（11 項参照）の確立に十分な数の実験を完了しない場合、初期の日常的な試験の間にその分布を構築しうることは許容可能である。この手法は、参考文献（8）に示されている推奨事項に従う必要があり、また、これらの実験で得られた陰性対照の結果は、公表されている陰性対照データと一致している必要がある。

13. 実験プロトコールに何らかの変更を加える場合には、その結果得られるデータと、試験施設の既存の背景対照データベースとの整合性の維持に及ぼす影響という観点から考察する必要がある。主要な不整合についてのみ、専門家の判断によりデータベースがこれまでの分布と異なると判定された場合、新たな背景対照データベースを確立する（11 項参照）。再確立の間、同時陰性対照の数値について、過去のデータベースか対応する公表データと一致していることを試験施設が立証できれば、完全な陰性対照データベースにより実際の試験実施を可能にする必要はないと考えられる。

14. 陰性対照データは、各動物における染色体構造異常（ギャップを除く）の発現率からなる。同時陰性対照は、理想的には、試験施設の陰性対照の背景データベースの分布の 95%管理限界内とする。同時陰性対照データがこの 95%管理限界から外れた場合、そのデータが極端な外れ値でなく、試験系が「管理下にある」（11 項参照）という証拠があり、技術的または人的な過誤の証拠がない限り、そのデータを背景対照の分布に組み入れるのは許容可能であると考えられる。

試験方法に関する説明

準備

動物種の選択

15. 一般に用いられている実験室系統の健康な若齢成獣を使用する。ラットが一般的に用いられるが、マウスも適切であると考えられる。報告書に科学的正当性の記載があれば、他の適切な哺乳類種を用いてもよい。

飼育および給餌条件

16. げっ歯類の場合、動物飼育室の温度は 22°C（±3°C）とする。相対湿度は 50～60%が理想的だが、40%以上を確保し、飼育室の清掃時を除いて 70%を超えないことが望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期の順序とする。給餌には、通常の実験室飼料を用いてよい。

© OECD, (2016)

飲水の摂取は制限しない。被験化学物質を混餌投与する場合、適切な混合飼料確保の必要性により、飼料の選択が影響を受ける可能性がある。げっ歯類では、攻撃行動が予測されない場合、同性の同一投与群を少数群（1 ケージあたり 5 匹以下）で飼育し、適切な環境を確保した頑丈な床のケージとすることが望ましい。科学的正当性がある場合のみ、動物を個別に飼育できる。

動物の準備

17. 健康な若齢成獣（げっ歯類の場合、投与開始時に 6～10 週齢であることが理想的であるが、この週齢をわずかに超えた動物も許容可能とする）を通常用い、対照群と投与群に無作為に割り付ける。各個体は、人道的で低侵襲の方法（例：足環、タグ、マイクロチップの装着あるいは生体認証が挙げられるが、耳パンチや指切法は用いない）により個体識別し、5 日間以上飼育室環境に馴化させる。またケージは、その位置による影響の可能性が最小限になるよう配置する。陽性対照と被験化学物質による交差汚染を回避する。試験開始時には、動物の体重のばらつきを最小限に抑え、雌雄ともそれぞれ平均体重の±20%の範囲内に収まるようにする。

投与の準備

18. 固体の被験化学物質は動物に投与する前に、適切な溶媒か媒体に溶解または懸濁するか、飼料または飲水に混ぜる。液体の被験化学物質は直接投与するか、希釈してから投与できる。吸入曝露の場合、被験化学物質は、その物理化学的性質に応じて気体、蒸気または固体／液体のエアロゾルとして投与できる。安定性データにより保存の許容性が立証され、適切な保存条件が定義されている場合を除き、被験化学物質は用時調製する。

溶媒／媒体

19. 溶媒／媒体は用いる投与量で毒性作用を示さず、被験化学物質との化学反応を起こす疑いのないものを用いる。既知以外の溶媒／媒体を用いる場合、採用するには、その適合性を示す参照データによる裏付けが必要である。可能な限り、まず水溶性の溶媒／媒体の使用を検討すべきであることが推奨される。一般に用いられる適合性のある溶媒／媒体の例には、水、生理食塩液、メチルセルロース溶液、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩溶液、オリーブ油およびコーン油が挙げられる。特殊な溶媒／媒体の選択により、構造異常も他の悪影響も生じないことを示した背景対照データまたは公表された対照データがない場合、本溶媒／媒体対照の許容性を確立するため、最初の試験を実施する必要がある。

対照

陽性対照

20. 通常、陽性対照物質を投与する動物群を試験ごとに設ける。ただし、試験施設が本試験実施の習熟度を立証し、陽性対照の背景データの範囲を確立している場合、この手順は免除できる。同時陽性対照群を設けない場合、実験ごとにスコアリング対照（scoring control）（固定した未染色スライド）を含める。この対照は、本試験のスコアリング範囲内に適切な基準試料を含めることで入手できる。基準試料は、本試験を実施する試験施設において、定期的（例：6～18 ヵ月ごと）に別途実施する陽性対照実験（例：習熟度検証試験の間や、その後必要に応じ定期的間隔）から入手され保存されている。

© OECD, (2016)

21. 陽性対照物質では、染色体構造異常細胞の頻度について、自然発生レベルを上回る検出可能な増加が確実に生じる必要がある。陽性対照の用量は、作用は明確であるが、コード化された試料の内容が測定者に直ちに明らかにされないよう選択する。陽性対照では、被験化学物質と異なる投与経路、異なる投与スケジュールの使用、および単一時点のみでの試料採取が許容可能である。さらに、適切な場合、化学物質クラス関連の陽性対照物質の使用を検討できる。陽性対照物質の例を表 1 に示す。

表 1. 陽性対照物質の例

物質名および CAS 番号
メタンスルホン酸エチル［CAS 番号 62-50-0］
メタンスルホン酸メチル［CAS 番号 66-27-3］
エチルニトロソ尿素［CAS 番号 759-73-9］
マイトマイシン C［CAS 番号 50-07-7］
シクロホスファミド（一水和物）［CAS 番号 50-18-0、（CAS 番号 6055-19-2）］
トリエチレンメラミン［CAS 番号 51-18-3］

陰性対照

22. 陰性対照群の動物を試料採取時ごとに設定し、被験化学物質の投与を受けないことを除き、それ以外は投与群と同様に取り扱う。被験化学物質を投与する際に溶媒／媒体を使用する場合、陰性対照群にはこの溶媒／媒体を投与する必要がある。ただし、試験施設での各試料採取時点に陰性対照の背景データにより、構造異常細胞の個体間のばらつきおよび頻度に関する一貫性が立証される場合、陰性対照の試料採取の必要性を 1 回のみとすることができる。陰性対照に 1 回の試料採取を用いる場合、試験で用いるのは最初の試料採取時点とする。

手順

動物数および性

23. 一般に、小核の反応は雌雄の動物間で類似しており（9）、このことは染色体構造異常にも当てはまると予測されるので、ほとんどの試験は雌雄いずれかで実施することが考えられる。雌雄間の妥当な差を立証するデータ（例：例えば、用量設定試験などでの全身毒性、代謝、バイオアベイラビリティ、骨髄毒性などの差）では、両性の使用を奨励することが考えられる。この場合、例えば、反復投与毒性試験の一部として、両性での試験を行うのが適切であると考えられる。両性を用いる場合、要因計画を用いるのが適切であると考えられる。要因計画を用いたデータ分析法の詳細を、補遺 2 に示す。

© OECD, (2016)

24. 試験開始時の動物数は、片性の分析可能な動物、あるいは両性を用いる場合には雌雄それぞれについて、1 群あたり最低 5 匹となることを目的として確立する。化学物質に対するヒトの曝露に関して、例えば、一部の医薬品のように性特異性を有すると考えられる場合、試験は適切な性で実施する。動物の通常の最大必要数の目安として、3 用量群および同時陰性対照群＋陽性対照群（各群とも片性の 5 匹から構成）を用いた 2 回の試料採取時点による骨髄試験では、45 匹の動物が必要になると考えられる。

© OECD, (2016)

投与量

25. 用量選択に役立つ既に入手可能な適切なデータがないため、予備的な用量設定試験を実施する場合、同一試験施設において主試験に用いられるのと同じ動物種、系統、性および投与計画を用いて行う（10）。この試験の目的は、最大耐量（MTD）を特定することである。MTD とは、試験を制限する毒性の証拠を示すことなく、忍容性が認められる最高用量と定義され、試験期間の長さに関連する（例：体重減少や造血系の細胞毒性の誘発）が、死亡や人道的な安楽死を必要とする疼痛、苦痛、疲弊の証拠は認められない用量である（11）。

26. 最高用量は、骨髄にある程度の毒性徴候をもたらす用量とも定義できる。

27. 毒物動態特性の飽和を示す物質、または長期投与後に曝露量減少を導きうる解毒過程を誘導する物質は、用量設定基準の例外と考えられ、ケースバイケースで評価する。

28. 用量反応性に関する情報を得るため、完全な試験では、陰性対照群および公比 2 で通常分けられるが 4 を超えない最低 3 段階の投与量を設ける必要がある。用量設定試験、または既存のデータに基づき被験化学物質が毒性を生じない場合、単回投与の最高用量は 2000 mg/kg 体重とする。一方、被験化学物質が毒性を生じる場合、MTD を最高投与量とし、用いる投与量は、この最高投与量から毒性をほとんどまたは全く生じない用量までの範囲を対象とするのが望ましい。検討したすべての投与量で標的組織（骨髄）に対する毒性が認められた場合、非毒性用量でさらなる試験を行うのが望ましい。定量的用量反応に関する情報をより完全に明らかにすることを意図した試験では、追加の用量群が必要と考えられる。特定の要件が適用されるある種の被験化学物質（例：ヒト用医薬品）の場合、その限度が変わる場合がある。

限度試験

29. 用量設定試験または関連する動物種の既存データについて、少なくとも限界用量（下記参照）の投与計画から観察可能な毒性作用を生じないことが示される場合（骨髄増殖の低下、および、それ以外の標的組織に対する細胞毒性の証拠が認められないなど）、ならびに、*in vitro* 遺伝毒性試験または構造的に関連のある物質のデータに基づき、遺伝毒性が予測されないと考えられる場合、被験化学物質の標的組織（骨髄）への到達が立証されていれば、3 段階の投与量を用いた完全な試験は必要ないとみなすことができる。こうした場合、限界用量での単一投与量で十分であると考えられる。14 日間を超える投与期間の場合、限界用量は 1000 mg/kg 体重/日とする。14 日間以内の投与期間の場合、限界用量は 2000 mg/kg 体重/日とする。

用量の投与

30. 試験を設計する際には、想定されるヒト曝露経路を考慮する。このため、正当性が示された場合、飼料、飲水、局所皮下、静脈内、経口（強制）、吸入、気管内、または埋植などの曝露経路が選択可能である。いかなる場合でも、標的組織の適切な曝露が確保される経路を選択する。腹腔内投与はヒトで意図される曝露経路ではないため、通常は推奨されず、特定の科学的正当性がある場合のみ用いる。被験化学物質を飼料または飲水に混ぜる場合、特に単回投与の例で

© OECD, (2016)

は、食餌や水の摂取から試料採取までの間隔を十分にとり、その作用が検出できるよう留意する必要がある（33～34 項参照）。強制経口投与または注射により 1 回に投与できる液体の最大容量は、被験動物の大きさによって異なる。最大容量は、通常 1 mL/100 g 体重を超えないものとするが、例外として、水溶液の場合は、最大で 2 mL/100 g を使用可能である。これを超える容量を用いる場合には、その正当性を示す必要がある。より高濃度で悪影響を通常もたらすことになる刺激性または腐食性の被験化学物質を除き、すべての投与量で体重に対する一定容量の投与を確保するため、濃度の調整により試験容量のばらつきを最小限に抑える。

投与スケジュール

31. 被験化学物質は通常単回投与とするが、大容量投与を容易にするため分割用量（すなわち、2～3 時間以内の間隔で同一日に 2 回以上投与すること）として投与できる。こうした状況下、または被験化学物質を吸入投与する場合、試料採取時点は最終投与時点または曝露終了時点に基づき予定する。

32. 本試験での反復投与プロトコールの適合性に関しては、入手可能なデータがほとんどない。しかし、本試験と反復投与毒性試験との統合が望ましい状況では、毒性量で生じうる染色体損傷を有する有糸分裂細胞の喪失を回避するよう留意する。最高用量が限界用量（29 項参照）以上である場合、および 1 用量群が投与期間持続中に限界用量を投与される場合、こうした統合は許容可能である。他の試験との統合が望まれる場合、小核試験（試験ガイドライン 474）が染色体異常には最適の *in vivo* 試験とみなされるはずである。

33. 骨髄試料は、単回投与後間隔をおいた 2 時点で採取する。げっ歯類の場合、最初の試料採取間隔は、1.5 倍の正常細胞周期長を完了するのに要する時間（投与期間後通常 12～18 時間）とする。被験化学物質の摂取および代謝ならびに細胞周期の速度に及ぼす影響に要する時間は、染色体異常検出の至適時間に影響を及ぼしうるため、次の試料採取は最初の試料採取時点の 24 時間後が推奨される。最初の試料採取時点では、すべての用量群に投与し分析用試料を採取すべきであるが、その後の試料採取時点では、最高用量群のみ投与を要する。科学的正当性に基づき 2 日間以上の投与計画を用いる場合、最終投与後、約 1.5 倍の正常細胞周期長を限度に、1 回の試料採取時期を通常用いる。

34. 投与後の試料採取前に、動物には適切な用量の分裂中期停止剤（例：コルセミド®またはコルヒチン）を腹腔内投与し、その後適切な間隔で試料を採取する。マウスの場合、その間隔は採取前約 3～5 時間、ラットの場合は 2～5 時間である。細胞を骨髄から採取後、低張処理、固定および染色し、染色体異常を分析する（12）。

観察

35. 望ましくは毎日同じ時点で、投与後に予測される作用が最大となる時間を考慮に入れた上で、1 日に少なくとも 1 回、被験動物の全身的な臨床観察を行い、臨床徴候を記録する。投与期間中は 1 日 2 回以上、すべての個体の病的状態や死亡について観察する。試験開始時、反復投与試験の間は週 1 回以上および安楽死の時点ですべての個体の体重を測定する。1 週間以上持続する試験の場合、摂餌量の測定を週 1 回以上行う。被験化学物質を飲水を介し投与する場合、水

© OECD, (2016)

消費量を水交換時ごとおよび週 1 回以上測定する。非致死性だが過度の毒性の指標を示した動物は、試験期間の完了前に人道的に安楽死させる（11）。

© OECD, (2016)

標的組織の曝露

36. 血液試料が必要とされ、他の曝露データが存在しない場合、骨髄曝露の発生を立証する目的で被験化学物質の血漿濃度の調査を可能にするため、血液試料を適切な時点で採取する（44項参照）。

骨髄および染色体標本

37. 人道的な安楽死の直後、動物の大腿骨または脛骨から骨髄細胞を入手し、低張液に浸漬し固定する。次に、確立された方法を用い、分裂中期細胞をスライドに広げ染色する（（3）（12）参照）。

分析

38. 分析前に、陽性対照および陰性対照を含むすべてのスライドを個別にコード化し、測定者に投与条件不明となるよう無作為化する。

39. すべての投与群（陽性対照を含む）、無処置または媒体／溶媒陰性対照群の動物について、1個体あたり1000個以上の細胞から細胞毒性の指標として分裂指数を求める。

40. 染色体構造異常を、ギャップを含む場合と除く場合について、各個体200例以上の分裂中期を分析する（6）。ただし、試験施設の陰性対照の背景データベースから、背景となる染色体構造異常の頻度の平均値が1%未満を示した場合、さらなる細胞のスコアリングを考慮する。染色分体型と染色体型の異常を区別して記録し、さらにサブタイプ（切断、交換）に分類する。試験施設が用いる手順では、染色体異常の分析が十分な訓練を受けた測定者により実施され、適宜ピアレビューされることを確保する。スライド標本作製手順により、一定の割合で分裂中期にしばしば切断を生じ、その結果染色体を喪失することが認められるため、スコア化する細胞は$2n\pm2$（nは使用動物種の染色体の一倍体数）以上の多数のセントロメアを対象とする。

データおよび報告

結果の処理

41. 動物のデータは、個体別に表形式で提示する。各個体について、分裂指数、スコア化した分裂中期細胞数、分裂中期細胞あたりの異常数および染色体構造異常を有する細胞の割合を評価する。様々な型の染色体構造異常について、投与群および対照群の数および頻度を表に示す。ギャップ、倍数体細胞、核内倍加染色体を有する細胞は区別して記録する。ギャップの頻度は報告するが、通常、構造異常の総頻度の分析には含めない。反応に性差の証拠が認められない場合、統計解析ではデータを結合できる。動物でみられた毒性および臨床徴候に関するデータも報告する必要がある。

© OECD, (2016)

許容基準

42. 試験の許容性は、以下の基準で判定する。

a) 同時陰性対照データについて、試験施設の背景対照データベースへの追加が許容可能とみなされる（11～14 項参照）。

b) 同時陽性対照またはスコアリング対照が、陽性対照の背景データベースで生成された反応と適合する反応をもたらし、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を生じている（20～21 項参照）。

c) 適切な用量数および細胞数により解析されている。

d) 最高用量の選択基準が、25～28 項記載の基準と一致している。

結果の評価および解釈

43. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合、被験化学物質は明らかに陽性であると判断される。

a) 少なくとも 1 つの投与群で、染色体構造異常（ギャップを除く）を有する細胞の頻度が、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を示している。

b) この増加を適切な傾向検定で評価した場合、少なくとも 1 つの試料採取時点で用量依存性がみられる。かつ、

c) これらの結果のいずれかが陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れている。

最高用量のみを特定の 1 つの試料採取時点で検討する場合、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められ、その結果が陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れていれば、被験化学物質は明らかに陽性であると判断される。適切な統計学的手法に関する勧告が参考文献（13）に見出せる。用量反応性の解析を実施する場合、3 用量以上の投与群を解析する必要がある。統計検定では、動物を実験単位として用いる。染色体異常試験の陽性結果は、被験化学物質が試験に用いた動物種の骨髄において、染色体構造異常を誘発することを示している。

44. すべての許容基準が満たされ、検討したすべての実験条件で、以下に該当する場合、被験化学物質は明らかに陰性であると判断される。

a) いずれの投与群でも、染色体構造異常（ギャップを除く）を有する細胞の頻度が、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を示していない。

b) 適切な傾向検定で評価した場合、いずれの試料採取時点においても、用量依存的な増加がみられない。

c) すべての結果が、陰性対照データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）内に収まる。かつ、

© OECD, (2016)

d) 被験物質への骨髄曝露が生じている。

最適な統計学的手法に関する勧告が参考文献（13）に見出せる。被験物質への骨髄曝露の証拠には、分裂指数の減少、または被験物質の血漿中もしくは血中濃度の測定結果が挙げられると考えられる。静脈内投与の場合、曝露の証拠は必要ない。代わりに、同一経路および同一動物種による無関係の試験で得られる ADME データを用いることで、骨髄曝露を立証できる。陰性結果は、試験条件下で、被験化学物質が試験に用いた動物種の骨髄において、染色体構造異常を誘発しないことを示している。

45. 明らかな陽性反応または明らかな陰性反応については、検証の必要はない。

46. 得られた反応が明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、また、ある結果（例：わずかな増加、または境界線上の増加）の生物学的妥当性の確立を支援するため、そのデータについて、専門家の判断および／または完了した既存の実験の追加調査により評価する必要がある。場合によっては、より多くの細胞数での分析または実験条件変更による再実験の実施が有用と考えられる。

47. まれに、追加調査を行っても、得られたデータから被験化学物質が陽性か陰性いずれの結果をもたらすか結論を出せず、そのため試験の結果が不明確と結論付けられる場合がある。

48. 分裂中期全体での倍数体および核内倍加を示した分裂中期の頻度は、区別して記録する必要がある。倍数体／核内倍加細胞数の増加は、被験化学物質が、有糸分裂過程や細胞周期の進行の阻害能があることを示しうる（3 項参照）。

試験報告書

49. 試験報告書は、以下の情報を含む。

要約

被験化学物質：

- 入手可能である場合、供給元、ロット番号、使用期限
- 既知の場合、被験化学物質の安定性

単一成分物質：

- 物理的外観、水溶性、およびさらに関連する物理化学的特性
- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合など、IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES 記法または InChI コード、構造式、純度、不純物の化学的同一性などでの化学物質の識別

多成分物質、UVCB 物質（組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生物材料）および混合物

- 成分の化学的識別（上記参照）、定量的発生、関連する物理化学的特性により、可能な限り特徴付ける。

被験化学物質の調製：

- 媒体選択の正当性

© OECD, (2016)

- 既知の場合、溶媒／媒体中の被験化学物質の溶解度および安定性
- 飼料、飲水または吸入用製剤の調製
- 実施した場合、製剤の分析判定（例：安定性、均一性、名目濃度）

被験動物：

- 使用した動物種／系統および使用の正当化
- 動物数、週齢および性
- 供給元、飼育条件、飼料など
- 動物の個体識別方法
- 短期試験の場合：試験開始時および終了時における個体別の体重；1 週間を超える試験の場合：試験中の各個体の体重および摂餌量。各群の体重範囲、平均値および標準偏差を含む。

試験条件：

- 陽性および陰性（媒体／溶媒）対照
- 実施した場合、用量設定試験のデータ
- 投与量選択の根拠
- 被験化学物質調製の詳細
- 被験化学物質投与の詳細
- 投与経路および投与期間の根拠
- 被験物質の全身循環または骨髄到達の検証方法
- 該当する場合、飼料／飲水中の被験化学物質の濃度（ppm）および消費量から算出される実際の投与量（mg/kg 体重/日）
- 飼料および水の品質の詳細
- 安楽死の方法
- 鎮痛方法（使用した場合）
- 投与および試料採取スケジュールの詳細な記述およびその選択の正当化
- スライド標本作製方法
- 毒性の測定方法
- 分裂中期停止に用いた化学物質の内容、その濃度、用量および投与から試料採取までの時間
- 試料の分離および保存手順
- 異常のスコア化基準
- 1 個体あたり分析した分裂中期細胞数および分裂指数判定のため分析した細胞数
- 試験の許容基準
- 試験結果を陽性、陰性あるいは結論できないとみなす基準

結果：

- 試験期間前および期間全体の動物の状態（毒性徴候を含む）

© OECD, (2016)

- 個体ごとに区別して示された分裂指数
- 個体ごとに区別して示された異常および異常細胞の型および数
- 1群あたりの異常の総数、その平均値および標準偏差
- 1群あたりの異常を有する細胞数、その平均値および標準偏差
- 確認された場合、倍数体細胞および／または核内倍加細胞の頻度などの倍数性の変化
- 可能な場合、用量反応関係
- 統計解析結果および適用した方法
- 骨髄曝露の発生を裏付けるデータ
- 同時陰性対照および陽性対照のデータ（範囲、平均値および標準偏差）
- 陰性対照および陽性対照の背景データ（範囲、平均値、標準偏差、その分布の95%管理限界、ならびに対象期間および観察数）
- 陽性または陰性反応を満たす基準

結果の考察

結論

参考文献

© OECD, (2016)

参考文献

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), **"Cytogenetic Tests in Mammals", in** *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. et al. (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, *Mutation Research*, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) Richold, M. et al. (1990), **"***In Vivo* **Cytogenetics Assays", in** *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(5) Tice, R.R. et al. (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, *Mutation Research*, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 417/1, pp. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(9) Hayashi, M. et al. (1994), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(10) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.

(11) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) Lovell, D.P. et al. (1989), "Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays", **in** *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

© OECD, (2016)

補遺 1

定義

異数性：1 本または複数の染色体により、正常な二倍体（または一倍体）の染色体数に生じる逸脱。ただし、完全なセット単位での染色体の倍加による場合は除く（倍数性を参照）。

セントロメア：細胞分裂中に紡錘糸が結合する染色体領域で、これにより、娘染色体が娘細胞の極に規則正しく移動できる。

染色分体型異常：1 本の染色分体の切断または染色分体間の切断および再結合として発現する染色体の構造的損傷。

染色体型異常：2 本の染色分体の同一部位における切断、または切断および再結合として発現する染色体の構造的損傷。

核内倍加：S 期の DNA 複製後に、核が有糸分裂に移行せず別の S 期を開始するプロセス。その結果、4 本、8 本、16 本…の染色分体数を有する染色体になる。

ギャップ：1 本の染色分体の幅より狭く、染色分体のずれが最小限に留まる非染色性の損傷部位。

分裂指数：ある細胞集団での有糸分裂細胞数と総細胞数との比で、当該細胞集団の増殖状況の尺度となる。

数的異常：用いた動物特有の正常な染色体数と、実際の染色体数とに生じる差（異数性）。

倍数性：完全なセット単位での染色体数の変化に関わる数的な染色体異常のことで、染色体セットの部分的な数的変化と対立する概念である（異数性を参照）。

染色体構造異常：細胞分裂中期の顕微鏡検査により検出可能な染色体の構造変化で、欠失および断片化、染色体内交換または染色体間交換として観察される。

© OECD, (2016)

補遺 2

In vivo 染色体異常試験において性差を特定するための要因計画

要因計画およびその解析

要因計画では、最低雄 5 匹および雌 5 匹を各濃度レベルで検討し、最低 40 匹の動物（雄 20 匹および雌 20 匹、加えて妥当な陽性対照）を用いた計画とする。

この計画は、より単純化した要因計画の 1 つであり、主効果としての性と濃度レベルとの二元配置分散分析に相当する。データは SPSS、SAS、STATA、Genstat など多くの標準的な統計ソフトウェアパッケージの使用や、R の使用により分析できる。

この解析ではデータセットのばらつきを、両性間のばらつき、濃度間のばらつき、および性と濃度との交互作用に関連するばらつきに分割している。同一濃度を投与された同性の動物群内での、同型動物（replicate animal）間におけるばらつきの推定値に対し、各条件の検定が行われる。根底にある方法論の全詳細は、多くの標準的な統計学の教科書（下記参考文献参照）、および統計パッケージと共に提供されている「ヘルプ」機能から入手可能である。

解析は、分散分析表（ANOVA table）における性×濃度の交互作用条件を検討することにより進める [1]。有意な交互作用条件がない場合、両性全体または濃度レベル全体を結合した値により、分散分析のプールされた群内のばらつきという条件に基づき、濃度レベル間での妥当な統計検定を行う。

解析では引き続き、濃度間のばらつきの推定値を対比により分割する。対比により、濃度レベル全体の反応について一次式と二次式の対比の検定を行う。性×濃度に有意な交互作用がある場合、この条件は一次×性と二次×性の交互作用という対比にも分割できる。これらの条件により、濃度に対する反応が雌雄間で同程度であるか、あるいは雌雄間で反応に差があるか検定を行う。

プールされた群内のばらつきの推定値を用いて、平均値間の差のペアワイズ検定を行える。こうした比較は、雌雄の平均値間、および、陰性対照とのレベル比較など様々な濃度レベルの平均値間で行えると考えられる。これらの例で有意な交互作用がある場合、片性内での様々な濃度の平均値間か、同一濃度での両性の平均値間で比較を行える。

参考文献

実験計画法で用いられる最も単純な二要因分析からより複雑な形式まで、要因計画の理論、設計、方法論、解析および解釈を考察した統計学の教科書は多数ある。以下は包括的なリストではない。類似する設計の成功例を記載した書籍もあれば、さまざまなソフトウェアパッケージ

[1] 一般線形モデル（GLM）の使用などのモデルリング法を採用する統計専門家は、様々ではあっても類似の方法で解析に取り組むことが考えられるが、コンピュータ導入以前の時代に開発された統計値を算出するアルゴリズム法にまで遡る、伝統的な分散分析表を得ることになるとは必ずしも限らない。

© OECD, (2016)

を用いて解析を実行するためのコードを記載したものもある。

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

© OECD, (2016)